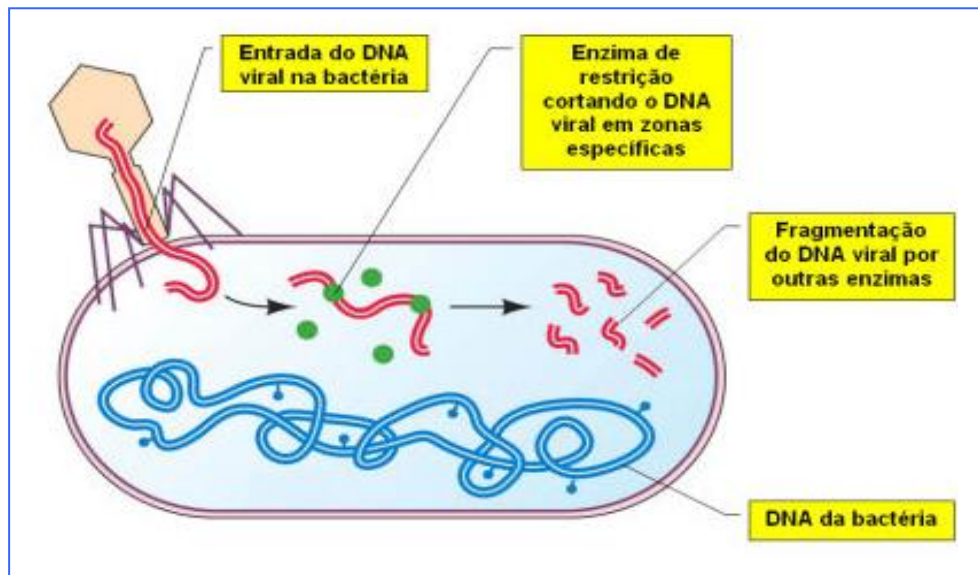
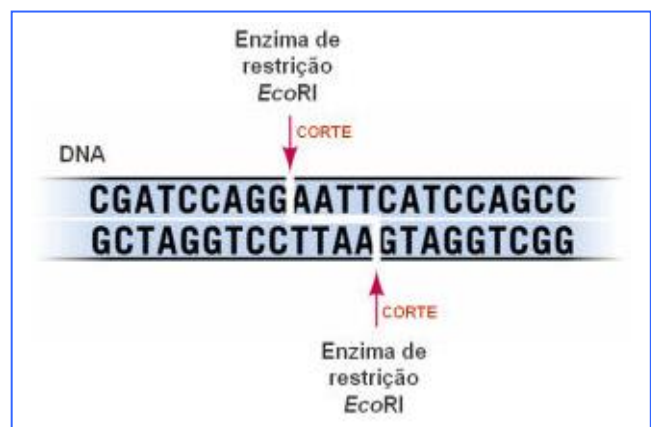
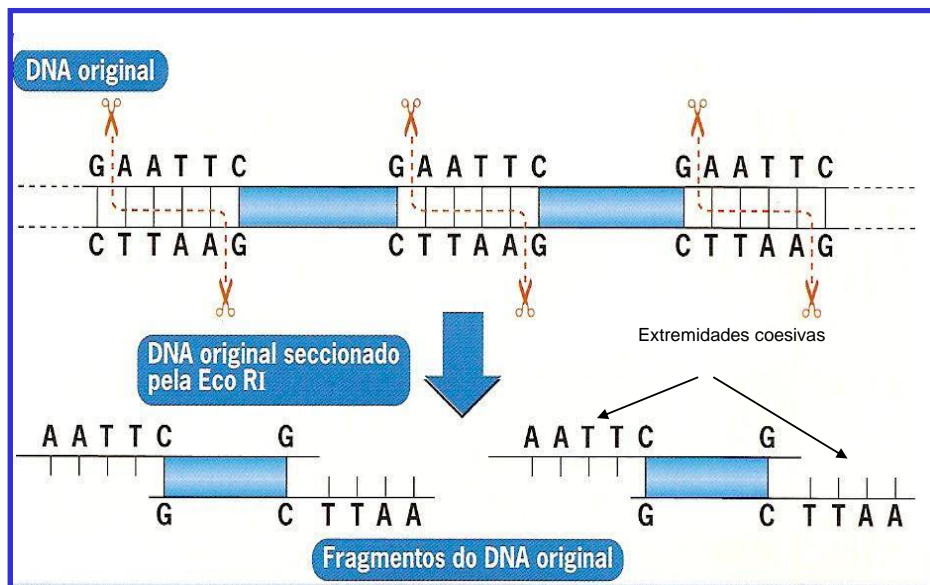
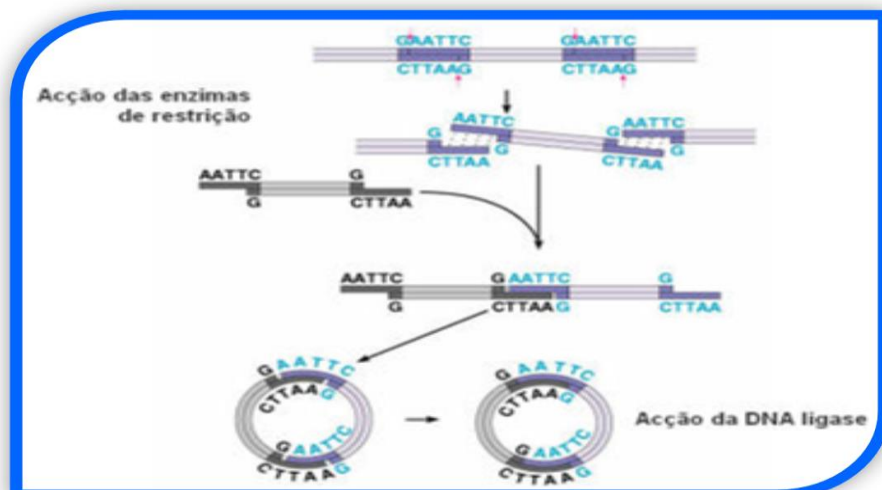
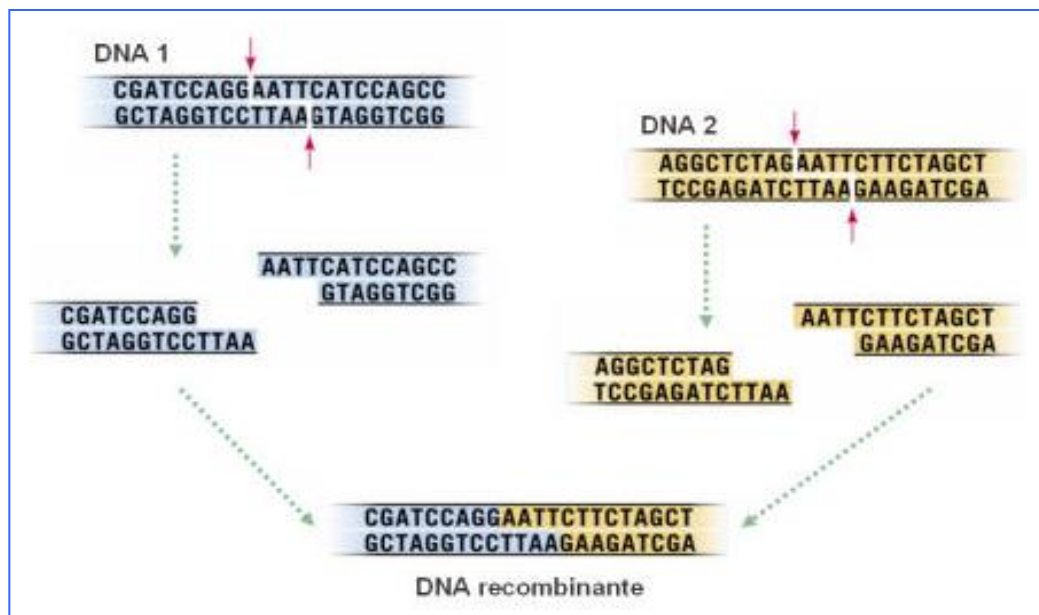
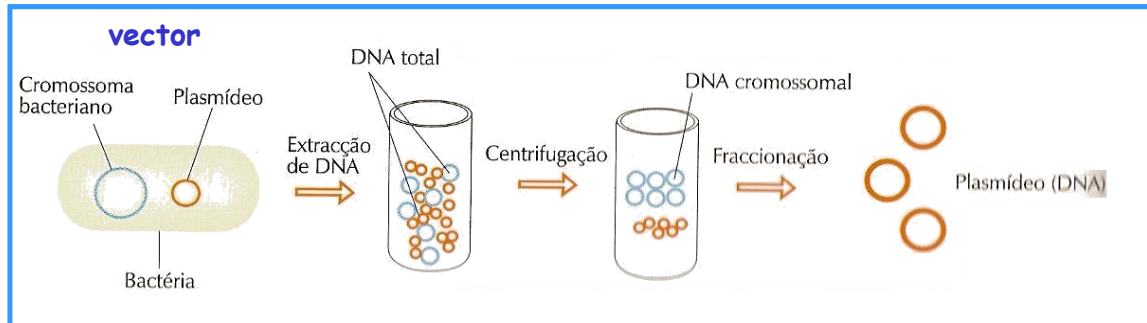
# Fundamentos de Engenharia Genética

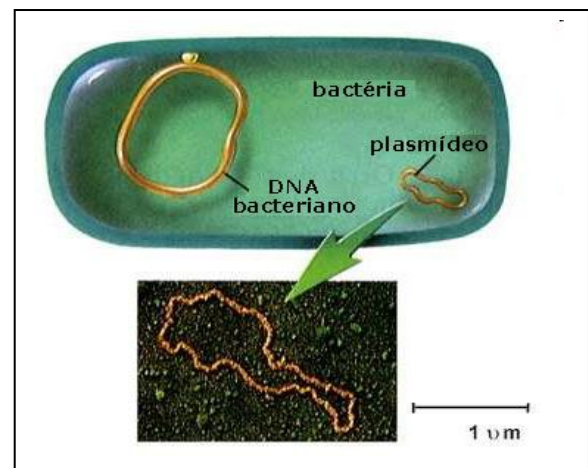
☞ A **engenharia genética** (desenvolvida a partir da década de 70 do séc.XX) baseia-se num conjunto de **técnicas** e **ferramentas** que permitem a intervenção no genoma de um organismo, construindo novos genomas por recombinação de segmentos genómicos de um mesmo ou de diferentes cromossomas.

☞ Um dos contributos mais importantes para a revolução biotecnológica, foi a descoberta de **enzimas de restrição** ou **endonucleases de restrição**. Estas enzimas cortam a hélice dupla do DNA em zonas específicas sempre que a encontram.

**☞ Descoberta das enzimas de restrição:**

‣ Os vírus invadem frequentemente as bactérias e afetam o seu DNA;
‣ Algumas bactérias possuem um mecanismo de defesa contra os vírus que consiste na produção de enzimas chamadas **endonucleases de restrição** ou **enzimas de restrição**, isto é, enzimas que cortam a cadeia de DNA do vírus quando encontram uma determinada sequência de bases.

Ex: A Eco1 reconhece a porção da dupla hélice 5´GAA TTC 3`e só cortará a molécula de DNA se encontrar esta sequência de bases nas duas cadeias e lidas sempre de 5´para 3´, fazendo um corte entre o nucleótido de guanina e o nucleótido de adenina em cada cadeia.

◆ Como resultado da atuação da enzima de restrição formam-se fragmentos de DNA, em hélice dupla, mas com uma pequena extensão em cadeia simples em cada extremidade. Estas porções terminais designam-se por **extremidades coesivas.**

◆ As extremidades coesivas podem ligar-se por complementaridade a outro DNA. Neste processo intervêm outras enzimas, as **ligases do DNA**, que catalisam o processo que permite que fragmentos de DNA se voltem a ligar.

✎ As enzimas de restrição e as ligases do DNA são ferramentas de engenharia genética que permitem manipular e transferir genes de uma molécula de DNA para outra, isto é, de um organismo para outro.
✎ Na transferência de genes é necessária a existência de um “transportador”, isto é, um **vetor** que leva o material genético de um genoma (dador) para outro (recetor).

✎ Vetores Utilizados na Engenharia Genética:

✔ **Bacteriófagos** (vírus que atacam bactérias);
✔ **Plasmídeos** de bactérias (os mais usados).

Plasmídeos:
▪ Muitas bactérias possuem, para além da molécula de DNA principal, pequenas moléculas de DNA em cadeia dupla – os **plasmídeos**.
▪ Geralmente, os genes dos plasmídeos não são essenciais à sobrevivência da bactéria, podendo ser retirados. Podem replicar-se independentemente da molécula de DNA principal, podendo fundir-se com ela.

## ☞ Técnicas de engenharia genética:

✔ DNA recombinante - **r DNA**

✔ DNA complementar - **c DNA**

✔ Impressões digitais genéticas - **DNA fingerprint**

✔ Reações de polimerização em cadeia - **PCR**

## ❀ TÉCNICA DO DNA RECOMBINANTE

Extração de DNA

Célula humana

Núcleo

DNA

*E. coli*

Plasmídeo

DNA da bactéria

Local de restrição do plasmídeo da bactéria

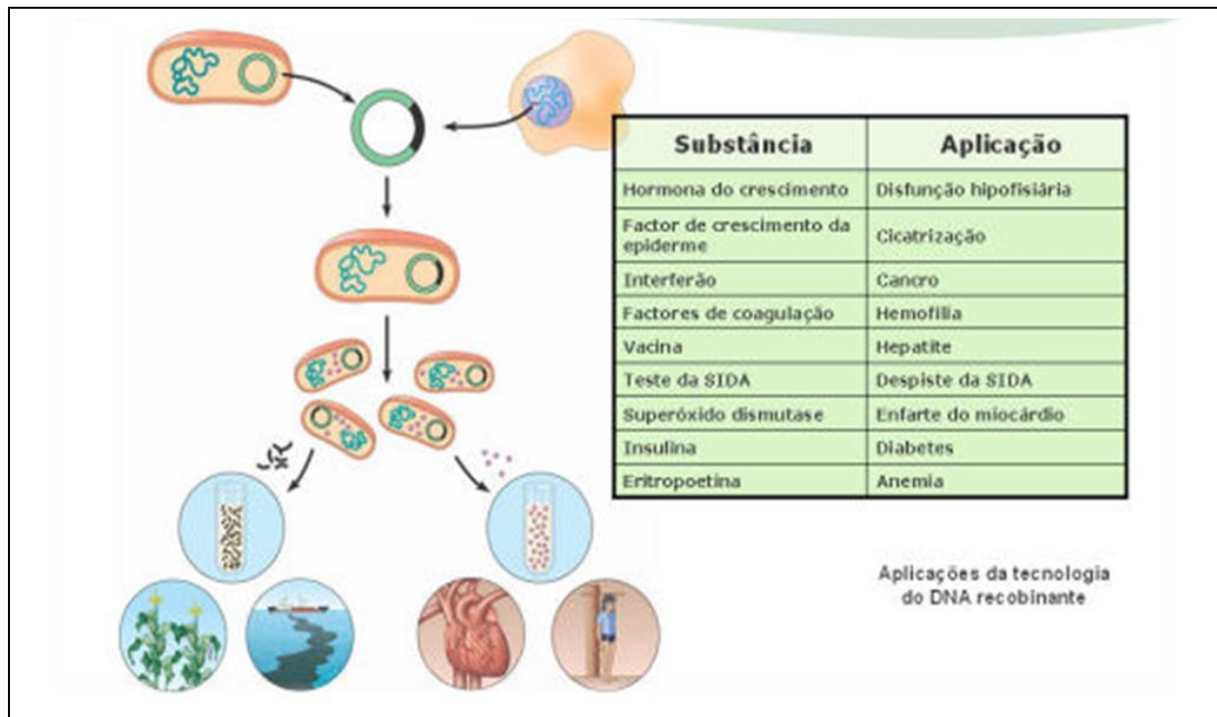
1. Isola-se o DNA de dois organismos (célula humana e bactéria)
2. O DNA de cada organismo é fragmentado pela mesma enzima de restrição
3. Extremidades livres das duas moléculas de DNA
4. A porção de DNA humano e o DNA do plasmídeo, com as extremidades livres, são postos em contacto
5. Adicionam-se ligases do DNA
6. O plasmídeo com DNA recombinante entra para algumas bactérias
7. As bactérias crescem num meio selectivo. Só as que têm o plasmídeo recombinante se reproduzem, formando colónias
8. Bactérias tendo cada uma delas cópias do gene humano

DNA recombinante

Plasmídeo com a porção de DNA humano com interesse

Bactérias crescem num meio de cultura

☞ **Aplicações da tecnologia do DNA recombinante (rDNA):**

| Substância | Aplicação |
|---|---|
| Hormona do crescimento | Disfunção hipofisiária |
| Factor de crescimento da epiderme | Cicatrização |
| Interferão | Cancro |
| Factores de coagulação | Hemofilia |
| Vacina | Hepatite |
| Teste da SIDA | Despiste da SIDA |
| Superóxido dismutase | Enfarte do miocárdio |
| Insulina | Diabetes |
| Eritropoetina | Anemia |



▶ **Investigação fundamental** → Torna possível isolar genes de organismos complexos e estudar as suas funções a nível molecular;

▶ **Produção de medicamentos/farmácia** → Um dos primeiros medicamentos obtidos através desta técnica foi a insulina. No passado, a insulina obtinha-se a partir do pâncreas de vacas ou de porcos (era difícil de purificar e não era exatamente igual ao humano, ocorrendo por vezes rejeição);

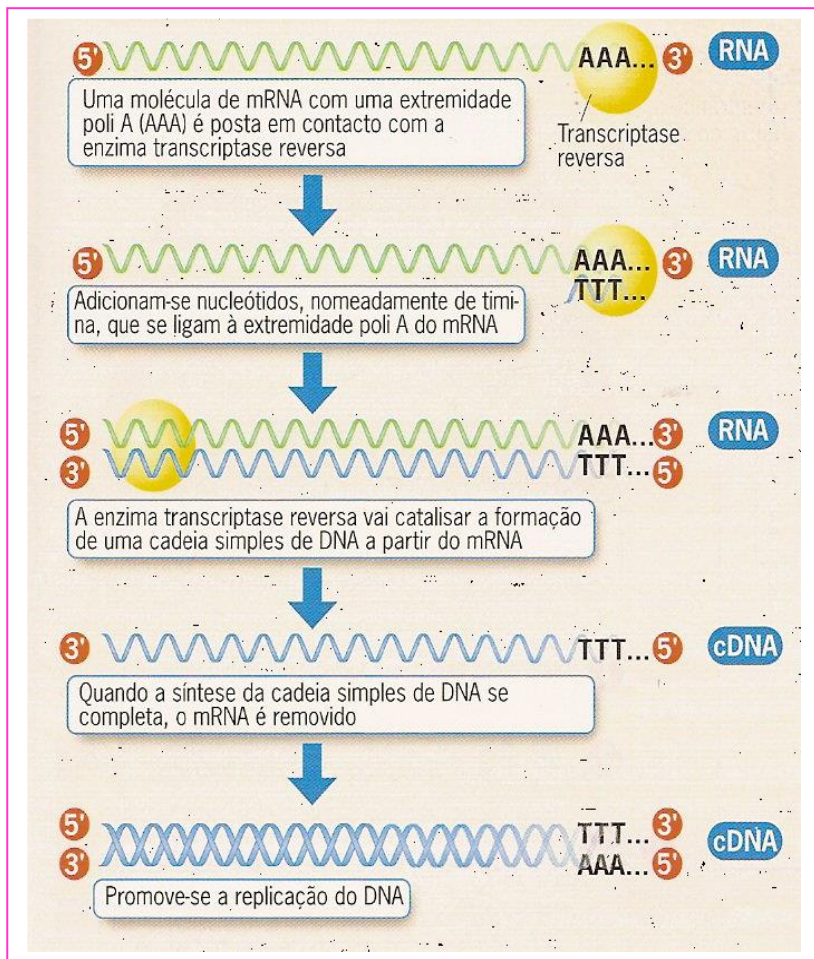
▶ **Obtenção de organismos geneticamente modificados (OGM)** → Os OGM são organismos em cujo genoma foram introduzidos genes que conferem características vantajosas.

## ❀ TÉCNICA DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

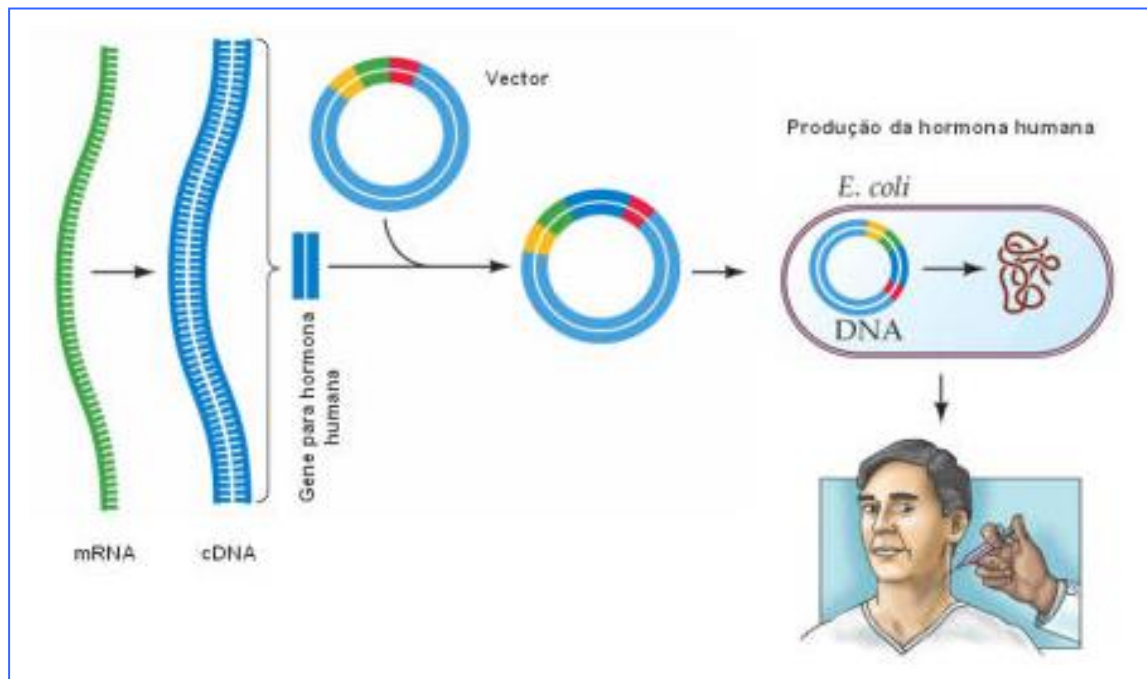
▸ Os procariontes são organismos muito utilizados em Engenharia Genética como recetores de DNA estranho porque são fáceis de cultivar, têm um crescimento rápido e processos bioquímicos bem conhecidos.

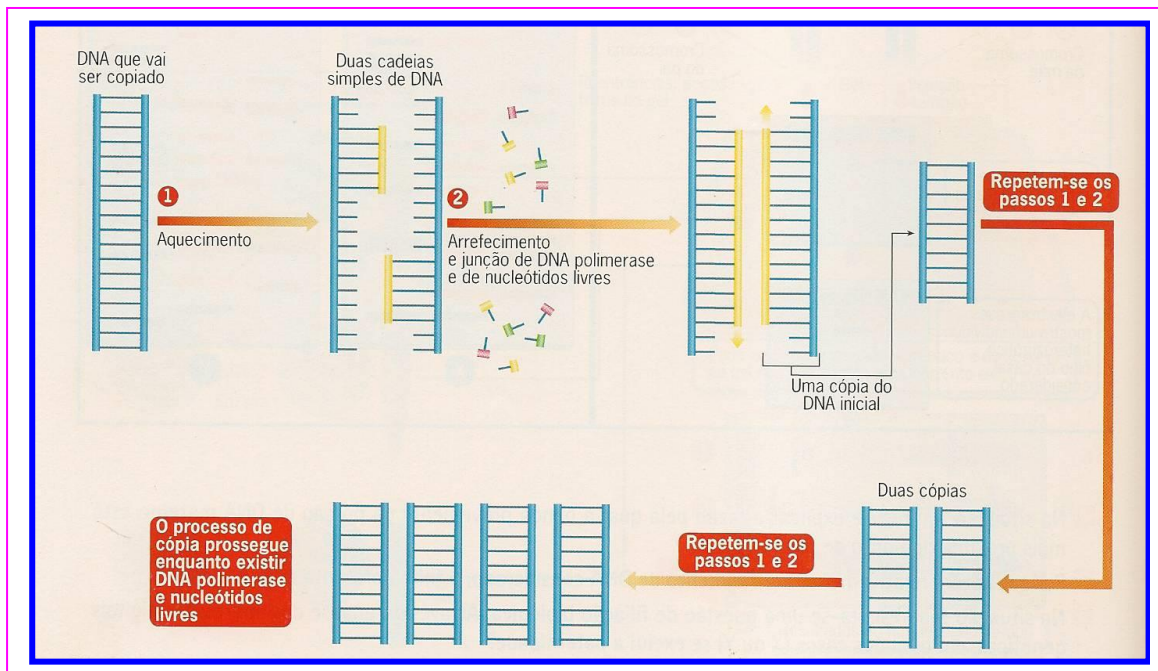
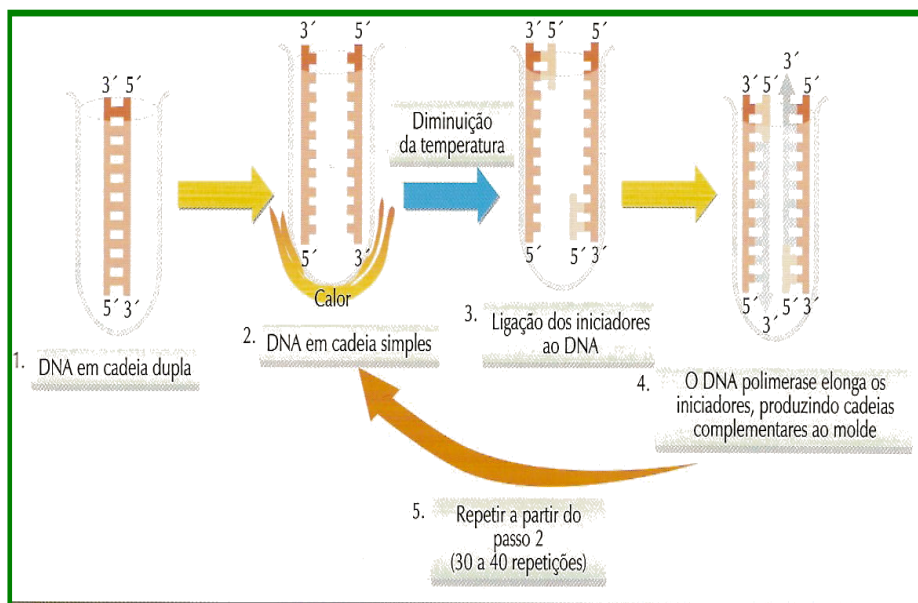
▸ No entanto, não processam o RNAm e, quando recebem genes com intrões, estes não são retirados e a proteína produzida não é funcional.

▸ Este problema pode ser ultrapassado pela obtenção e transferência de DNA complementar.

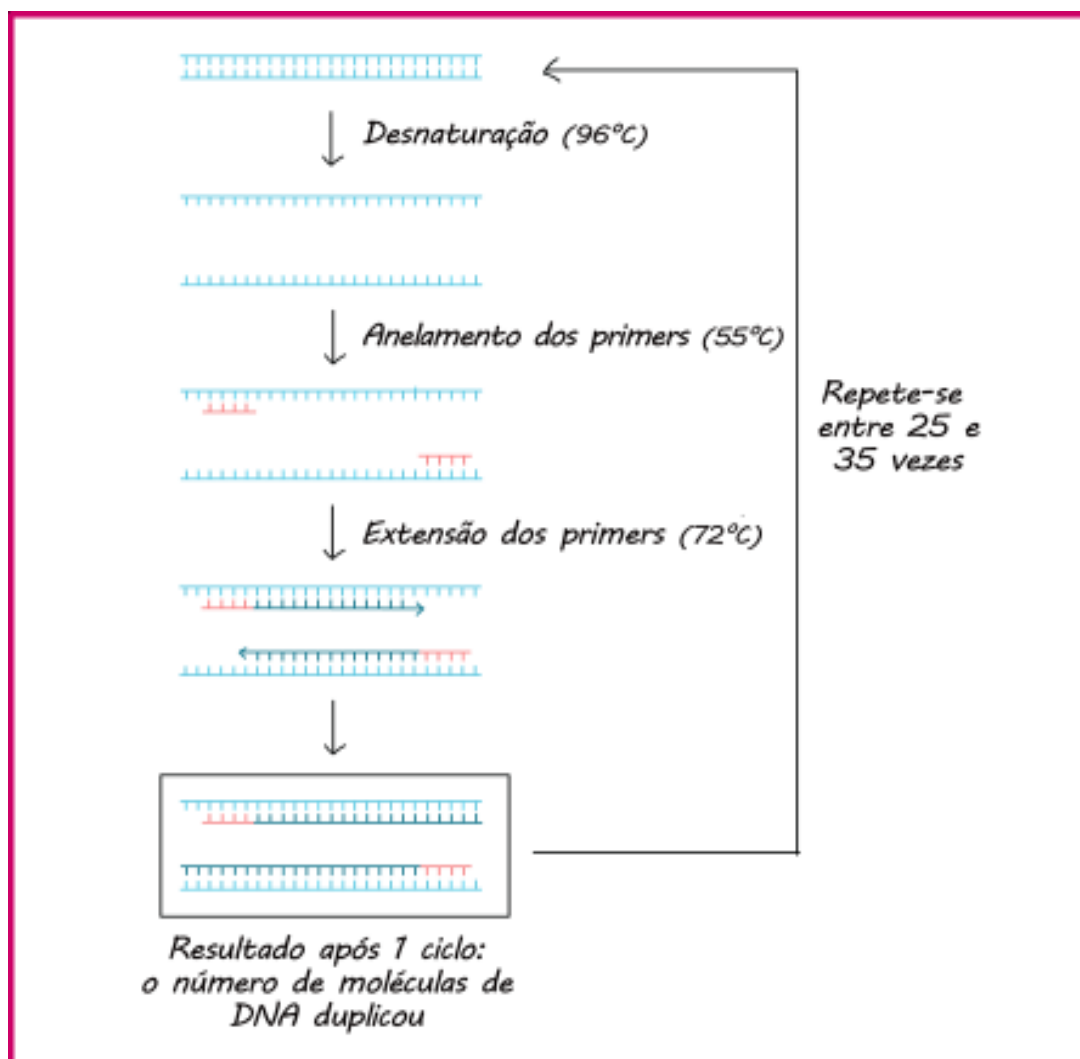
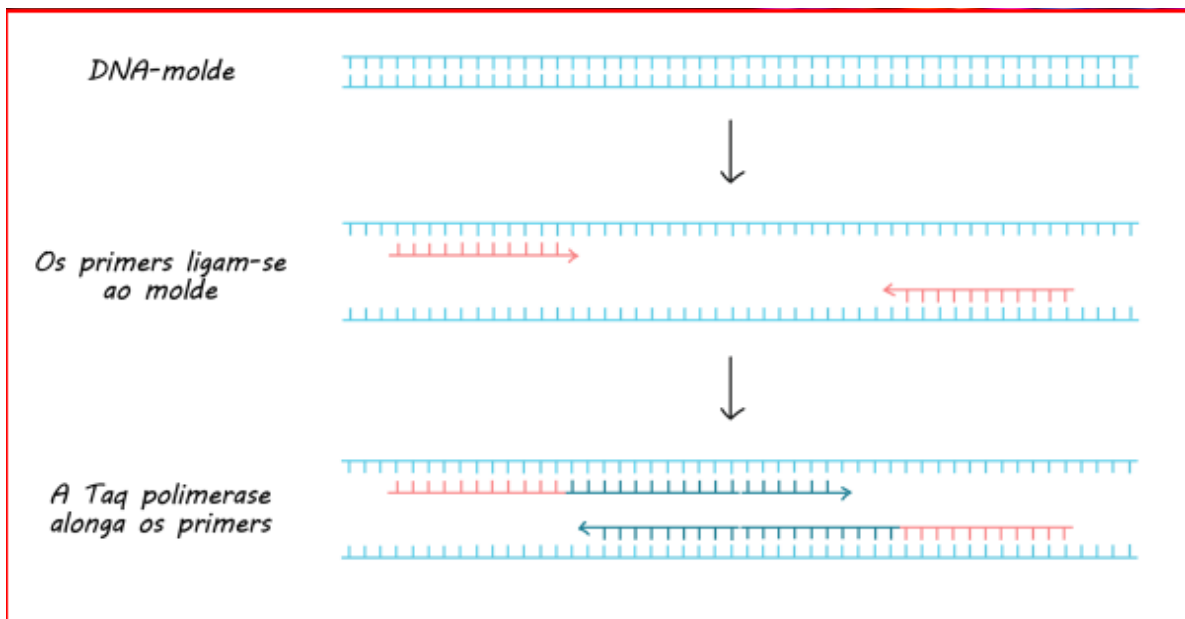
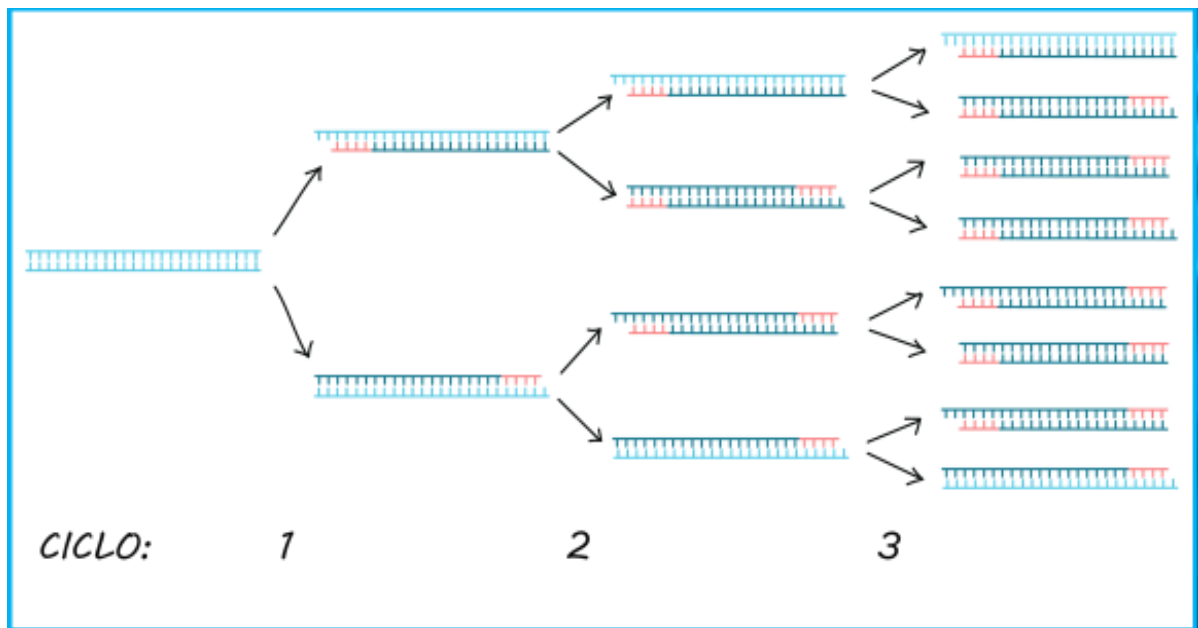
▸ O cDNA é uma molécula de DNA sem intrões que é obtida a partir de uma molécula de RNAm funcional (que já sofreu processamento), pela regra da complementaridade das bases.

<u>O processo de obtenção de cDNA é o seguinte:</u>
1º - Isola-se uma molécula de RNAm funcional da células;
2º - Adiciona-se transcriptase reversa e nucleótidos livres. A transcriptase reversa catalisa a síntese de uma cadeia simples de DNA a partir de um molde de RNAm;
3º - Junta-se uma enzima que degrada o RNAm que serviu de molde e DNA polimerase que catalisa a formação da cadeia complementar do DNA.

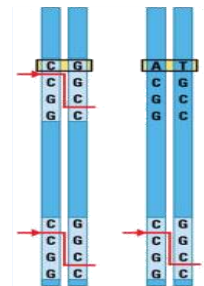
☛ **Aplicações da tecnologia do DNA complementar:**

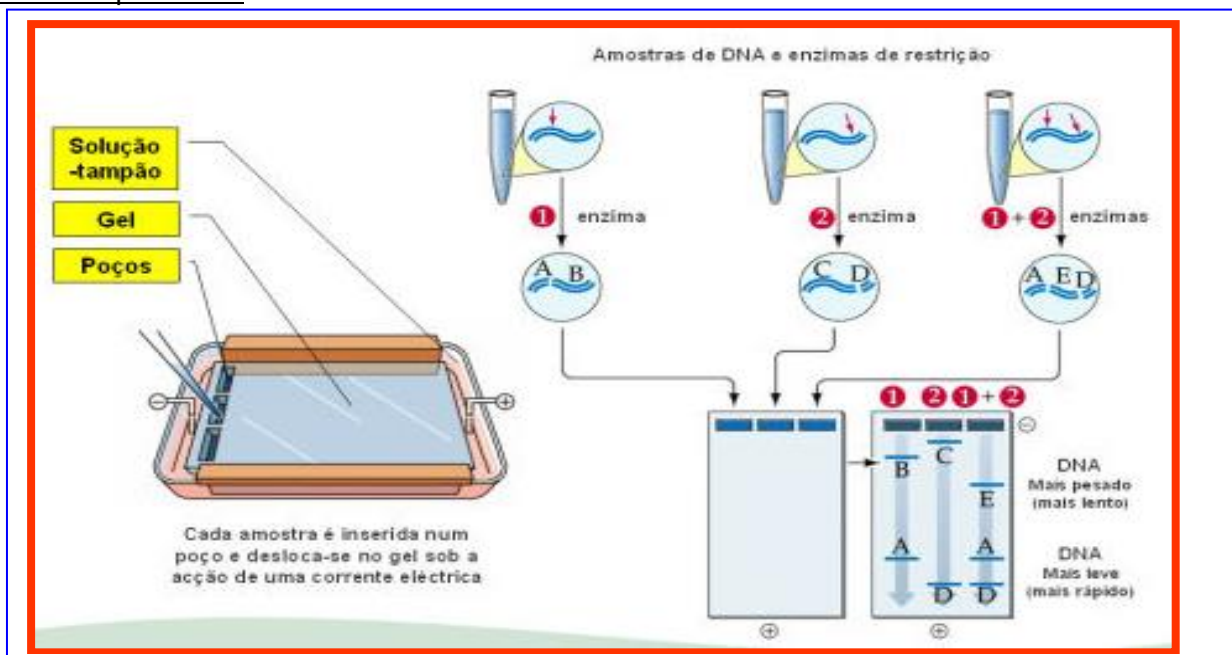
Obtenção de cópias de genes que codificam produtos com interesse para o Homem.
Ex.Torna possível a produção de proteínas humanas por procariontes.

## ❀ REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA - PCR

‣ A reação de polimerização em cadeia (PCR) é uma técnica que permite clonar DNA de modo a obter grandes quantidades desta molécula, a partir de uma pequena amostra.

‣ Fases do processo:
1º - O fragmento de DNA a amplificar é aquecido de modo a separar as duas cadeias da dupla hélice;
2º - Adicionam-se nucleótidos livres e DNA polimerase resistente ao calor (obtida a partir de microrganismos termófilos). A DNA polimerase catalisa a formação das cadeias complementares reconstituindo a dupla hélice;
3º - O procedimento é repetido e em cada ciclo a quantidade de DNA duplica.

☞ **Aplicações do PCR no quotidiano:**
✔ Diagnóstico de doenças hereditárias;
✔ Diagnóstico de doenças infeciosas;
✔ Amplificação do DNA a partir de fragmentos isolados;

✓ Estudos forenses;
✓ Estudos moleculares de evolução.

▸ Esquemas das Fases do processo de PCR:

## ❀ DNA FINGERPRINT

◆ Cada indivíduo tem o seu próprio DNA, que é único (exceto para os gémeos verdadeiros);
◆ No seio do DNA encontram-se zonas de restrição – sequências repetitivas ao longo da molécula – cujo nº, tamanho e localização são variáveis de indivíduo para indivíduo.

☞ Submetido à ação de enzimas de restrição, o DNA fragmenta-se em porções de diferentes tamanhos e pesos moleculares.
☞ Estes pedaços de DNA, sujeitos a eletroforese, revelam um padrão de fragmentos de restrição que é único para cada indivíduo, funcionando como um "código de barras" genético → **Impressão digital genética.**

▸ Fases do processo:

1º → extração do DNA;

2º → utilização de enzimas de restrição para fracturação do DNA em pedaços de diferentes tamanhos (de acordo com a localização das zonas de restrição que variam de indivíduos para indivíduo);

3º → os fragmentos de DNA são colocados num meio apropriado (gel agarose) e, posteriormente, submetidos a um campo elétrico, o qual leva a que eles se desloquem a velocidades diferentes;

4º → ao fim de algum tempo vão localizar-se em zonas diferentes (os de menores dimensões ficam mais próximo do elétrodo positivo);

5º → esse meio é posteriormente observado com métodos apropriados (radiações UV), identificando-se o indivíduo pelo número de fragmentos em que o DNA foi dividido.

☛ **Aplicações da análise do DNA fingerprint:**

✓ na resolução de problemas de filiação biológica;
✓ ciência forense (investigação criminal);
✓ resolução de problemas de História;